



Regeneração de germoplasma de amendoim (*Arachis hypogaea*) *in vitro*

Julita Maria Frota Chagas Carvalho¹

Juliana Pereira de Castro²

Cristiane Miranda Furtado²

Taís de Moraes Falleiro Suassuna³

José Wellington dos Santos⁴

Tatiana da Silva Santos⁵

O amendoim é uma leguminosa anual, que apresenta grande variação nos tipos e raças cultivados, é reconhecido por ser uma rica fonte de proteína, contendo em seus grãos aproximadamente 20-25 % de proteína de alta qualidade e 45 % de óleo comestível (GODOY, et al., 1999).

No Brasil, o amendoim é cultivado principalmente nas regiões Sudeste, Sul, Nordeste e Centro Oeste. Segundo Barros et al. (1994) e Santos (1995) na região Nordeste, o seu cultivo é basicamente uma atividade de pequenos e médios produtores, os quais utilizam baixo nível tecnológico, sendo comum o uso e a reutilização de sementes de populações locais, o que resulta em baixa produtividade e elevado custo de produção.

Segundo (IBPGR, 1991), germoplasma é o material que constitui a base física da herança e se transmite de uma geração para outra através de células reprodutivas. Numa visão mais ampla, germoplasma pode ser considerado a soma total dos materiais hereditários de uma espécie.

O banco de germoplasma destina-se à preservação

da máxima variabilidade genética vegetal existente, desde as modernas cultivares até as espécies silvestres, tendo como objetivos: conservar fontes genéticas para futuro uso em melhoramento e estudos em genética; manter coleções de diferentes genótipos devidamente caracterizados e avaliados para uso em programas de melhoramento; prevenir e evitar a perda de recursos genéticos. Segundo Towill, (2000) este conceito pode ser restrito ao conjunto de genótipos disponíveis para melhoramento de uma espécie cultivada. A diversidade contida em um germoplasma deve ser protegida de eventuais perdas para garantir a sua utilização.

As sementes de amendoim são consideradas sub-ortodoxas, já que podem tolerar condições utilizadas em bancos de sementes, por menores períodos de tempo que as sementes ortodoxas, provavelmente como consequência do alto conteúdo lipídico e da fragilidade do tegumento externo. A viabilidade das sementes estocadas depende de vários fatores, como conteúdo hídrico, conteúdo de óleo, genótipo, condições de estocagem e contaminação. Perdas de germoplasma podem existir mesmo sob condições

¹Eng. Agr. Dr. Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143, Centenário, 58107-720, Campina Grande PB, e-mail: julita@cnpa.embrapa.br

²Bióloga, UEPB, Campina Grande PB.

³Eng. Agr. D.Sc. Embrapa Algodão, e-mail: tais@cnpa.embrapa.br

⁴Agr. M.Sc. em Estatística, Embrapa Algodão, e-mail: jwsantos@cnpa.embrapa.br

⁵Graduada em Estatística UEPB

ótimas, devido ao grande número de alterações prejudiciais que ocorrem durante a estocagem e resultam em anormalidades citológicas e metabólicas da semente. As sementes de algumas espécies de *Arachis* perdem a viabilidade após 2 a 3 anos de estocagem e a maioria não germina após períodos maiores que 10-12 anos (MORRIS, *et al.* *apud* MANSUR, 2001).

Por este motivo às técnicas de propagação vegetativa *in vitro* se adequam a programa de introdução, armazenamento e intercâmbio de germoplasma, contribuindo para prevenir a perda de variabilidade genética. No entanto, o uso da biotecnologia no melhoramento genético das plantas depende de protocolos de regeneração *in vitro* a partir da cultura de células e/ou de tecidos.

O presente trabalho objetivou regenerar três acessos do banco ativo de germoplasma, determinando o melhor pré-tratamento e o melhor meio de cultivo para regeneração de sementes que após seis anos de armazenamento em câmara fria a 10-15°C e 60% de umidade relativa apresentavam 0% de germinação em condições de campo.

As sementes dos acessos 2AM, 8AM e 9AM provenientes de Caicó, Rio Grande do Norte – Brasil; Salvador, Bahia – Brasil; e Alagoinha, Paraíba – Brasil, respectivamente, do banco ativo de germoplasma de amendoim da Embrapa Algodão foram desinfestadas inicialmente, em álcool 70% por um minuto e depois imersas em solução contendo hipoclorito de sódio a 1,8% de cloro ativo e uma gota de Tween 20, durante vinte minutos, e em seguida lavados quatro vezes em água bidestilada estéril; posteriormente, sementes de cada acesso foram submetidas a três pré-tratamentos de imersão de sementes: A) sementes a seco, em que os eixos embrionários foram retirados imediatamente às lavagens; B) imersão durante 24 horas na última água bidestilada estéril; e C) imersão em solução de ácido giberélico (GA3) a 0,75mgL⁻¹ por 24 horas.

Após os pré-tratamentos retirou-se das sementes na câmara de fluxo laminar, o eixo embrionário, que foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10mL do meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) (MS0) ou do meio MS suplementado com 3 mgL⁻¹ de

6- benzilaminopurina (BAP) (MS1). Os meios de cultivo foram suplementados com 30 g/L de sacarose e 0,55% de ágar, e o pH ajustado para 5,7 utilizando-se NaOH ou HCL antes da autoclavagem a 120 °C. Em seguida os tubos de ensaio foram fechados com tampa de polietileno e vedados com parafilme. As culturas permaneceram no escuro durante 72 horas, e posteriormente foram mantidas durante 25 dias a 25 ± 2°C, com um fotoperíodo de 16h de luz/8h de escuro e intensidade luminosa de 30μmol m⁻² s.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial 3x3x2 (Três acessos, três pré-tratamentos e dois meios de cultivo com oito repetições).

Após a coleta dos dados, procedeu-se à análise da variância, com os dados transformados em $y = \sqrt{x+1}$. A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (GOMES, 1985).

Na Tabela 1 apresenta-se o resumo da análise da variância para à variável número de brotos por semente regenerada, observando-se efeito significativo para acesso, meio de cultivo e para as interações acesso x meio de cultivo e pré-tratamento x meio de cultivo; entretanto, não houve

Tabela 1. Resumo da análise de variância referente à variável número de brotos por semente regenerada.

Fonte de Variação	GL	Quadrados Médios
Acesso (A)	2	1,523 *
Pré-tratamento (T)	2	0,053 ns
Meio de cultivo (M)	1	2,374 **
AxT	4	0,067 ns
AxM	2	0,419 *
TxM	2	0,645 **
AxTxM	4	0,057 ns
Erro	126	-
CV%	-	26,020

** Significativo (p < 0,01) pelo teste de F

* Significativo (p < 0,05)

ns Não significativo (p > 0,05).

efeito significativo para pré-tratamento isolado, para interação acesso x pré-tratamento nem para interação acesso x pré-tratamento x meio de cultivo.

As interações acesso x meio de cultivo, pré-tratamento x meio de cultivo significativas, indicam comportamento diferencial dos acessos e dos pré-tratamentos nos diferentes meios de cultivo constatando-se, assim, que os efeitos acesso e meio de cultivo e pré-tratamento e meio de cultivo não são independentes, uma vez que as respostas dos acessos e dos pré-tratamentos podem diferir de acordo com o meio de cultivo.

Nas tabelas 2 e 3, têm-se os resultados do desdobramento das interações significativas entre acesso x meio de cultivo e pré-tratamento x meio de cultivo, respectivamente. Os resultados correspondem ao número de brotos por semente regenerada. Observou-se superioridade de todos os acessos quando inoculadas em meio MS suplementado com 3 mgL⁻¹ de 6- benzilaminopurina

(BAP), sendo o acesso 2AM o que obteve o maior número de brotos por semente regenerada em meio MS + 1 mgL⁻¹. O pré-tratamento imersão por 24 horas em solução de ácido giberélico (GA3) a 0,75mgL⁻¹ por 24 horas apesar de não diferenciar significativamente isolado obteve grande êxito quando os eixos embrionários foram inoculados em meio MS suplementado com 3 mgL⁻¹ de (BAP).

Conclusões

- O melhor meio de cultivo utilizado foi o MS suplementado com 3 mgL⁻¹ de 6- benzilaminopurina (BAP) ocorrendo uma maior formação de brotos no acesso 2AM.
- Imersão por 24 horas em solução de ácido giberélico a 0,75mgL⁻¹ por 24 horas promove uma maior formação de brotos quando inoculadas em meio MS suplementado com 3 mgL⁻¹ BAP.

Referências Bibliográficas

- BARROS, M.A.L.; SANTOS, R.C. dos; ARAÚJO, J.M. de; SANTOS, J.W. dos; OLIVEIRA, S.R. de M. **Diagnóstico preliminar da cultura do amendoim no Estado da Bahia**. In Embrapa Algodão. CNPA (Campina Grande, PB) Relatório técnico anual 1992-1993. Campina Grande, 1994b. p.381-383.
- GODOY, I.J. de; MORAES, S.A. de; ZANOTTO, M.D.; SANTOS, R.C. Melhoramento do Amendoim. In: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa, 1999UFV, p.51-94.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 11 ed. Piracicaba: Nobel, 1985. 466p.
- IBPGR (Roma Itália). **Advisory committee on in vitro storage**. Rome, 1983.
- MANSUR, E. Resgate de acessos inviáveis e preservação *in vitro* de germoplasma de *Arachis*.. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3. 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

Tabela 2. Valores médios referente à variável número de brotos por semente regenerada.

Acesso	Meio de cultivo	
	MS0	MS1
2 AM	1,31aA	1,78bB
8 AM	1,14aA	1,28aA
9 AM	1,19aA	1,34aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Tabela 3. Valores médios dos fatores meio de cultivo e Pré-tratamento, referente a variável número de brotos por semente regenerada

Pré-tratamento	Meio de cultivo	
	MS0	MS1
Imersão em água	1,19aA	1,54abB
Sem imersão	1,31aA	1,30aA
Imersão em GA3	1,14aA	1,56bB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

SANTOS, R.C. dos. Peanut crop: A viable alternative to Brazilian Northeast growers. **Ciência e cultura**, v.47, p.9-10, 1995.

TOWILL, L.E. Germoplasm preservation. IN: TRIGIANO, R.N.; GREY, D.J. ed. **Plant tissue culture concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p.337-353.

**Comunicado
Técnico, 237**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
58107-720 Campina Grande, PB
Fone: (83) 3315 4300 Fax: (83) 3315 4367
e-mail: sac@cnpa.embrapa.br
1ª Edição
Tiragem: 500



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



**Comitê de
Publicações**

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho
Secretária Executiva: Nivia M.S. Gomes
Membros: Demóstenes M.P. de Azevedo
José Wellington dos Santos
Lúcia Helena A. Araujo
Maria Auxiliadora Lemos Barros
Maria José da Silva e Luz
Napoleão Esberard de M. Beltrão
Rosa Maria Mendes Freire

Expedientes: Supervisor Editorial: Nivia M.S. Gomes
Revisão de Texto: Nisia Luciano Leão
Tratamento das ilustrações: Geraldo F. de S. Filho
Editoração Eletrônica: Geraldo F. de S. Filho